

FEDERAL REPUBLIC OF GERMANY

Priority Certificate of Filing of a Patent Application

Application Number: 103 01 522.1

Date of Filing: 17 January 2003

Applicant/Owner: Bruker Daltonik GmbH, Bremen/DE

Title: Determination of Terminal Sequences using
MALDI Granddaughter Ion Spectra

IPC: G 01 N 27/62

**The accompanying pages are a proper and exact reproduction of
the original documentation of this patent application.**

Munich, 17 December 2003

German Patent and Trademark Office

Signing for the President

Agurks



Bestimmung terminaler Sequenzen durch Enkelionenspektren in Tandem-Massenspektrometern

Die Erfindung betrifft die Spektrenaufnahme von Biopolymeren, besonders von Proteinen, in Tandem-Massenspektrometern mit Ionisierung durch matrixunterstützte Laserdesorption (MALDI) für die Überprüfung oder die Bestimmung von Sequenzmustern.

Die Erfindung besteht darin, Enkelionenspektren von terminalen Fragmentionen der Biopolymere in Tandem-Massenspektrometern zu messen, indem eine so genannte In-Source-Fragmentierung zur Erzeugung einer ersten Generation von Fragment- oder Tochterionen eines Biopolymers mit einer nachfolgenden Messung von Enkelionen, die durch eine weitere Fragmentierung einer ausgewählten Sorte von Tochterionen gewonnen wurden, gekoppelt wird. Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt die Bestimmung der terminalen Sequenzen, die sonst nur mit Schwierigkeiten gemessen werden können.

Stand der Technik

Die massenspektrometrische Bestimmung der endständigen Sequenzmuster von größeren Proteinen einschließlich möglicher Modifikationen dieser Sequenzen ist in der Regel schwierig. Selbst nicht-massenspektrometrische Verfahren, wie beispielsweise der Edman-Abbau, der normalerweise wenigstens die N-terminale Sequenz zu bestimmen gestattet, versagen im Falle von N-terminalen Modifikationen.

In Massenspektrometern mit MALDI-Ionenquellen ist eine gleichmäßige Fragmentierung größerer Proteine bis zu den Termini hin nicht möglich. Zwar gelingt eine direkte Ionisierung großer Proteine mit gleichzeitiger Fragmentierung mit einem so genanntem in-Source-Zerfall (in-source decay, ISD), doch lässt sich die endständigen Sequenzmuster wegen stark im unteren Massenbereich verrauschter Spektren nicht erkennen.

Die Verwendung von Elektrosprüh-Ionisierung, die für große Moleküle geeignet ist, ist in der Regel mit der Verwendung von Ionenfallen-Massenspektrometern oder Quadrupolfilter-Massenspektrometern gekoppelt. In diesen Fällen lassen sich die Ionen der Proteine zwar (mit einiger Mühe) fragmentieren, die kleinen Ionen der endständigen Fragmente sind aber wegen mangelnden Speicherfähigkeit dieser Spektrometer im unteren Masse-zu-Ladungs-Bereich nicht messbar.

Bei einem vorausgehenden enzymatischen Verdau der größeren Proteine, wie er für die Identifizierung der Proteine anhand von „Fingerprintspektren“ verwendet wird, lassen sich grundsätzlich die endständigen Verdaupeptide nicht mehr als solche erkennen. Ein Ausweg ist die biochemische Markierung der N- oder C-Termini in einer solchen Weise, dass sie in den Massenspektren als endständig erkannt werden können. Doch auch dieser Ausweg versagt, wenn die enzymatische Spaltung relativ nahe an einem der Termini erfolgt; es ist dann das entstehende Verdaupeptid zu kurz, um mit massenspektrometrischen Mitteln nachgewiesen zu

werden, wobei die Gründe dafür bei verschiedenen Arten von Massenspektrometern recht verschieden sind.

Die Bestimmung der endständigen Sequenzen ist aber in verschiedenen Anwendungsgebieten wichtig. Als Beispiel sei hier die Überprüfung der endständigen Sequenzen zur Qualitätskontrolle für synthetisierte Proteine genannt. Bei der häufig angewandten rekombinanten Synthese durch eingeschleuste Gene in Produktionsbakterien (für gewöhnlich E. Coli) treten Probleme mit der sauberen Abspaltung der Erkennungssequenzen (beispielsweise His-Tags) oder mit der Erkennung der Stop-Codons durch die bakterieneigenen Polymerasen auf. Aber auch bei der chemischen Synthese treten Probleme mit unerwünschten Modifikationen der Proteinenden auf.

Für die Untersuchungen von Sequenzen von Biopolymeren werden im Allgemeinen Tandem-Massenspektrometer verwendet. Diese bestanden ursprünglich stets aus zwei räumlich getrennten Massenspektrometern, zwischen denen sich eine Stoßzelle für die Fragmentierung von Ionen befand. Im ersten Spektrometer wurde eine Ionensorte ausgewählt, deren Ionen dann in der Stoßzelle zumindest teilweise fragmentiert wurden. Die entstehenden „Fragmentionen“ oder „Tochterionen“ werden dann im zweiten Spektrometer analysiert, das Ergebnis ist ein „Tochterionenspektrum“. Ein Beispiel ist das „Triple-Quad-MS“, das zwischen zwei Quadrupolfilter-Massenspektrometern ein weiteres Quadrupol als Stoßzelle besitzt. Neben dieses Prinzip des „Tandem im Raum“ ist in neuerer Zeit das Prinzip „Tandem in der Zeit“ getreten: In einem speichernden Massenspektrometer werden Ionenselektion, Fragmentierung und Aufnahme des Tochterionenspektrums zeitlich nacheinander in der selben Speicherzelle durchgeführt. Als speichernde Massenspektrometer werden Hochfrequenz-Ionenfallen-Massenspektrometer oder Fourier-Transform-Massenspektrometer (FTMS) verwendet. Die Messverfahren für die Aufnahme von Tochterionenspektren werden häufig abgekürzt als MS/MS-Verfahren bezeichnet.

Für die Aufnahme von Tochterionenspektren mit einer Ionisierung durch matrix-unterstützte Laserdesorption (MALDI) werden unter anderem Tandem-Flugzeitmassenspektrometer eingesetzt. Diese bestehen aus einem ersten Spektrometer mit einem Ionenselektor zur Auswahl der zu untersuchenden Ionen und der aus ihnen gebildeten Tochterionen, und einem zweiten Spektrometer zur Analyse der Tochterionen. Tandem-Flugzeitmassenspektrometer für diese Messverfahren mit Ionisierung durch matrix-unterstützte Laserdesorption (MALDI) sind kommerziell erhältlich, sie werden häufig als TOF/TOF-Massenspektrometer bezeichnet. Die Ionisierung durch MALDI ist insofern günstig, als im Wesentlichen nur einfach geladene Molekülionen der Analytsubstanzen gebildet werden. Das erlaubt es, in eine Probe verschiedenartige Substanzen zusammenzumischen, beispielsweise die verschiedenen tryptischen Verdaupeptide eines Proteins, und dann die Ionen dieser Substanzen nacheinander auf ihre Tochterionen zu untersuchen.

Es werden hier aus Gründen einer einfachen Bezeichnung die Ionen derjenigen primär gebildeten Ionensorte, deren Struktur durch Fragmentierungen untersucht werden soll, als „Auswahlionen“ bezeichnet. Die Bezeichnung wird hier gewählt, weil diese Ionensorte aus dem Gemisch von primären Ionen in irgendeiner Weise ausgewählt (selektiert) werden muss, gleichgültig, ob diese Auswahl vor oder nach weiterer Fragmentierung geschieht. Diese Auswahl geschieht normalerweise mit dem ersten Massenspektrometer eines Tandem-Massenspektrometers. Durch Zerfallsprozesse verschiedener Art entstehen aus diesen Auswahlionen „Fragmentionen einer ersten Fragmentierungsgeneration“ und nicht mehr massenspektrometrisch sichtbare Neutralbruchstücke. Diese Fragmentionen der ersten Fragmentierungsgeneration werden hier einfach als „Fragmentionen“ oder „Tochterionen“ bezeichnet. Mit einem Zerfall hört natürlich die Existenz des Auswahlions auf. In der Regel bleiben aber immer genügend der Auswahlionen unzerfallen zurück, so dass deren Signal auch im Tochterionenspektrum zu sehen ist.

Die Tochterionen können durch verschiedenartige Prozesse weiter zu „Fragmentionen der zweiten Generation“ zerlegt werden, diese werden hier durchgängig als „Enkelionen“ bezeichnet. Im Enkelionenspektrum sind meistens noch Tochterionen zu sehen, da auch die zweite Fragmentierung in der Regel nicht alle Tochterionen erfasst.

Für die Fragmentierung der Auswahlionen zu Tochterionen stehen in TOF/TOF-Geräten weithin bekannt zwei verschiedene Fragmentierungsverfahren zur Verfügung: die Stoßfragmentierung in einem Stoßgas in einer Stoßzelle (CID = Collisionally Induced Decomposition) und der metastabile Zerfall von Ionen durch erhöhte Energieaufnahme im lasererzeugten Plasma (LID = Laser Induced Decomposition). Beide Arten von Zerfällen finden nach der Beschleunigung der Ionen, darunter auch der Auswahlionen, in der feldfreien Flugstrecke des ersten Flugzeitmassenspektrometers statt. In beiden Fällen fliegen daher die jeweils erzeugten Tochterionen der Auswahlionen gleich schnell wie die nicht zerfallenen Auswahlionen. Es können also die Tochterionen gemeinsam mit den nicht zerfallenen Auswahlionen nach einer geschwindigkeitsdispargierenden Flugstrecke durch Zeitauswahl mittels eines Ionenselektors für die nachfolgende Analyse im zweiten Spektrometer aus der Gesamtheit der in der Ionenquelle erzeugten Ionen ausgewählt werden. Auf das genaue Verfahren dieser Auswahl und der nachfolgenden Analyse der Tochterionen nach einer Zwischenbeschleunigung vor dem zweiten Flugzeitmassenspektrometer werde hier nicht näher eingegangen. Das Grundprinzip eines TOF/TOF-Massenspektrometers ist in der Patentschrift DE 198 56 014 C1 (entsprechend US 6,300,627) wiedergegeben.

Dem nichtspontanen metastabilen Zerfall (LID) der Ionen geht eine innere Thermalisierung, also eine statistische Gleichverteilung der im Laserplasma aufgenommenen Überschussenergie auf alle Schwingungssysteme des Ions voraus. Die Bindungen im kettenartigen Ion gleichen einem komplizierten System gekoppelter Schwingungen, in denen die vorhandene

Energie durch die gekoppelten Schwingungsvorgänge ständig statistisch umverteilt wird. Übersteigt an einer relativen schwachen Bindungsstelle in der Kette des Moleküls die momentan angehäuften Energie die Bindungsenergie dieser Stelle, so kann es hier zu einem Bruch der Kette kommen. Es werden dabei ganz bevorzugt Tochterionen der b- und y-Fragmentierungsreihen gebildet, außerdem gibt es häufig noch Ionen der (b-17)-Reihe.

Es wird hier die Nomenklatur verwendet, die auf Roepsdorf und Fohlmann fußt, in der durch Johnson, Martin, und Biemann 1988 überarbeiteten Form (Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc. 86, 137-154). Die grundlegenden Fragmentierungsreihen a, b, c, x, y und z und ihre Indizierungen sind schematisch in Abbildung 1 wiedergegeben. Wird ein einfach geladenes Proteinion an der Bindungsstelle zwischen der Aminogruppe der vorhergehenden Aminosäure und der Carboxylgruppe der nachfolgenden Aminosäure gespalten, so sprechen wir von Fragmentionen der b-Reihe, wenn es sich um N-terminale Ionen, und um Ionen der y-Reihe, wenn es sich um C-terminale Ionen handelt. Es kommt bei der Unterscheidung der Fragmentierungsreihen in b und y also darauf an, auf welchem der beiden entstehenden Bruchstücke das ionisierende Proton verbleibt. Das jeweils andere Ende wird zum Neutralbruchstück. (Bei der Fragmentierung von doppelt geladenen Proteinionen können sowohl N- wie auch C-terminale Bruchstückionen gebildet werden; das ist jedoch bei den ganz überwiegend einfach geladenen MALDI-Ionen kaum möglich). Indizes an den Buchstaben b oder y geben an, welche Bruchstelle im Ion gespalten wurde; die Zählung fängt für b-Ionen am N-Terminus an, für y-Ionen dagegen am C-Terminus. – Findet die Spaltung um ein Kohlenstoffatom weiter zum N-terminalen Ende statt, so sprechen wir von Ionen der a- bzw. x-Reihe, mit analoger Zählung für die Indices. Findet sie um das Stickstoffatom weiter versetzt zum C-terminalen Ende statt, so erhalten wir Ionen der c- bzw. z-Reihe. Außerdem gibt es häufig noch Ionen, bei denen beispielsweise NH_3 , gelegentlich auch H_2O , abgespalten ist, sie werden dann als Ionen der (b-17)-Reihe (oder der (b-18)-Reihe) bezeichnet, mit Indices, die an die Klammer angehängt sind. (Manchmal wird die Klammer auch aus Gründen einer kurzen Darstellung in Spektren weggelassen).

Da die jeweils schwächsten Bindungen (eben die Bindungen, die zu b- oder y-Reihen führen) zwischen den Aminosäuren eines Peptids nicht unter sich jeweils gleiche Bindungsenergie besitzen, sondern durchaus verschieden stark sind, werden bestimmte Bindungen seltener gebrochen als andere. Beispielsweise sind die Bindungen von Prolin zu Prolin fester als der Durchschnitt der Bindungen zwischen Aminosäuren, daher werden diese Bindungen etwas seltener fragmentiert, und die resultierenden Bruchstückionen treten seltener auf. Die zugehörigen Massensignale im Spektrum (Peaks) sind daher schwächer als die anderer Fragmentionen.

Der stoßinduzierte Zerfall (CID) unterscheidet sich vom metastabilen Zerfall dadurch, dass noch Ionen hinzukommen, die durch Seitenkettenbrüche erzeugt werden (so genannte d- oder

w-Ionen). Auch können Ionen zweifache Brüche erleiden, so dass nicht-terminale („interne“) Bruchstückionen entstehen können, die dann als $b_n y_m$ bezeichnet werden.

Die in TOF/TOF-Massenspektrometern erzeugten Tochterionenspektren von Verdaupeptiden werden im Allgemeinen zur Bestätigung von Proteinidentifizierungen verwendet, die zunächst aus so genannten „Fingerprintspektren“ der enzymatischen Verdaupeptide des Proteins gewonnen wurden. Die Bestätigung dieser Identifizierungen durch die Tochterionenspektren einzelner Verdaupeptide findet mit Hilfe so genannter Suchprogramme statt, die in Datenbanken mit Hunderttausenden von gespeicherten Proteinsequenzen arbeiten. Verschiedenartige Suchprogramme solcher Art sind kommerziell erhältlich.

Die Tochterionenspektren dienen aber darüberhinaus der de-novo-Sequenzbestimmung von solchen Proteinen, deren Sequenz nicht in den Datenbanken enthalten sind. Diese Sequenzbestimmungen, für die ebenfalls kommerzielle Rechenprogramme erhältlich sind, sind allerdings schwierig und meist nicht eindeutig, so dass man in der Regel eine Vielzahl an Vorschlägen erhält. Die Tochterionenspektren mit ihrem Durcheinander an b-, y-, internen und (b-17)-Ionen sind sehr komplex, daher ist die Sequenzbestimmung oft nicht eindeutig und häufig auch nur für Teilsequenzen erfolgreich. Es werden daher dringend Verfahren gesucht, die eine einfachere und eindeutige de-novo-Sequenzbestimmung erlauben.

Es ist nun seit längerem auch eine dritte Art der Fragmentierung von Ionen in MALDI-Massenspektrometern bekannt, die allerdings bisher selten angewandt wird und aus bisher nicht bekannten Gründen auch nicht in allen kommerziellen MALDI-Ionenquellen gleich gut funktioniert: die In-Source-Fragmentierung (ISD = In-Source Decay), die einfach durch eine höhere Laserenergiedichte im MALDI-Prozess erzeugt wird (siehe beispielsweise D.C.Reiber et al., „Unknown Peptide Sequencing Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization and In-Source Decay“, Anal. Chem. **1998**, 70, 1214-1222). Dieses Verfahren zur Tochterionenerzeugung unterscheidet sich insofern grundlegend von den beiden anderen Arten der Fragmentierung, als die Fragmentierung spontan (innerhalb von etwa 10^{-8} Sekunden) vor der Beschleunigung der Ionen in der Ionenquelle stattfindet. Die heute für MALDI-Ionenquellen durchwegs angewandte verzögerte Beschleunigung der Ionen (DE = Delayed Extraction) trennt die Zerfallszeit deutlich von der Beschleunigungsphase ab; die spontan zerfallenden Ionen können also sauber nachgewiesen werden, da bei Einsatz der Beschleunigung nach einigen 10^{-8} Sekunden diese spontanen Zerfallsprozesse im Wesentlichen abgeschlossen sind. Die Fragmentionen haben damit nach Verlassen der Ionenquelle massenabhängig verschiedene Geschwindigkeiten. Diese Arten von Fragmentionen können also bereits in einem einfachen Flugzeitmassenspektrometer getrennt und analysiert werden. Diese Art der Fragmentierung funktioniert besonders gut für intakte Proteine in der Größenordnung von beispielsweise 6000 bis 70 000 atomaren Masseneinheiten.

Für die Anwendung der In-Source-Fragmentierung ist es allerdings erforderlich, dass die Analytsubstanzen der Ionenquelle getrennt und in guter Reinheit zugeführt werden, da sonst so komplexe Spektren entstehen, dass sie nicht mehr interpretiert werden können. Es wird also für dieses Verfahren bei der Präparation der Probe auf einem Probenträger nur eine
5 einzige Analytsubstanz mit der Matrixsubstanz gemischt aufgebracht. Das Aufbringen eines Verdauungsmischs entfällt; es ist aber gerade der große Vorteil dieser Ionisierung und Fragmentierung, dass sie für große Proteine anwendbar ist.

Bei der In-Source-Fragmentierung handelt sich nicht um ein MS/MS-Verfahren im eigentlichen Sinne, da das erste Massenspektrometer zur Auswahl der zu untersuchenden Ionen aus
10 dem komplexen Ionengemisch fehlt. Diese Auswahl wird einem externen Reinigungsverfahren für die untersuchte Substanz, zum Beispiel einer chromatographischen Reinigung, zugeschoben. Auch die Verwendung einer synthetisierten Substanz, beispielsweise eines rekombinanten Proteins, kann an diese Stelle treten. Das Aufbringen einer einzigen, reinen Substanz ist insbesondere für komplexere Substanzen notwendig, wie zum Beispiel für Proteine. Würden
15 mehrere Proteine, deren Ionen zu sehr vielen Tochterionen zerfallen, in vergleichbaren Konzentrationen aufgebracht, so würden so komplexe Spektren entstehen, dass diese nicht mehr entschlüsselbar wären. Die Methode ist also nur für die Strukturbestimmung von relativ reinen Substanzen geeignet.

Wenn man auch nicht von einem MS/MS-Verfahren sprechen kann, so werden jedoch un-
20 zweifelhaft wie in einem MS/MS-Verfahren Fragment- oder Tochterionen der zu untersuchenden Substanz gemessen.

Die Tochterionenspektren, die durch In-Source-Fragmentierungen (ISD) gewonnen werden, sehen deutlich anders aus, als die Tochterionenspektren, die durch CID oder LID gewonnen werden. Die Art der Fragmentierung des In-Source-Zerfalls ist aller Wahrscheinlichkeit nach
25 eine so genannte Elektroneneinfangdissoziation (ECD = Electron Capture Dissociation), und es ist tatsächlich festzustellen, dass die Fragmentionenspektren der ISD mit ihrer starken Bevorzugung der c-Fragmentreihe weitgehend den Tochterionenspektren gleichen, die in geeigneten Massenspektrometern durch ECD gewonnen werden.

Die spontanen Fragmentierungen, die bei leicht erhöhter Laserenergiedichte im Explosions-
30 plasma des Laserschusses auftreten, finden wie bei ECD vermutlich in solchen Ionen statt, die zunächst im heißen Laserplasma durch zweifache Protonierung doppelt geladen waren. Werden diese Ionen durch die gleichzeitig vorhandenen Elektronen um eine Ladungsstufe neutralisiert, so wird die Ionisierungsenergie (genauer: die Protonenaffinitätsenergie) frei und in Schwingungsenergie umgewandelt. Die auf das Ion punktuell übertragene Energie ist so
35 hoch, dass es sofort (in weniger als 10^{-8} Sekunden) in engster Umgebung der Rekombinationsstelle zu einem Bruch des kettenförmigen Moleküls kommt. Die eine Molekülhälfte trägt

die restliche Ladung und ist damit ein analysierbares Ion, während die andere Hälfte zum Neutralteilchen wird, das sich einer weiteren massenspektrometrischen Analyse entzieht.

Proteinspektren, die durch ISD entstehen, enthalten bevorzugt Tochterionen der c-Reihe für N-terminale Ionen, die in auffällig hohen Ionensignalen vorhanden sind, und der y-Reihe für C-terminale Ionen. Wegen der Ringstruktur des Prolins fehlen allerdings die c-Ionen von Brüchen vor Prolinen völlig, da sie eine doppelte Bindung aufbrechen müssten. Die c-Ionen sind am C-Terminus nicht – wie die b-Ionen – durch COH abgeschlossen, sondern haben hier eine Amid-Struktur (CONH₂). Für kleinere Ionen treten auch a-Ionen auf. Die Fragmentierung ist jedoch stark matrix- und größenabhängig. So treten bei Verwendung von α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure (CHCA) als Matrix die Tochterionen der a-Reihe wesentlich stärker auf, die bei Verwendung von 2,5-Dihydroxy-Benzoesäure (DHB) in weit geringeren Intensitäten oder bei 3,5-Dimethoxy-4-Hydroxy-Zimtsäure (Sinapinsäure) als Matrix nur noch ganz wenig gefunden werden.

Wegen der in etwa über die Länge des Proteins gleich verteilten Lokalisierungswahrscheinlichkeit des neutralisierten Protons werden alle Bindungen zwischen den Aminosäuren von den Brüchen in etwa gleichem Maße betroffen, eine Ausnahme bilden die Brüche zu den Prolinen. Es werden also alle Fragmentionen verschiedener Länge in etwa gleichen Konzentrationen gebildet, ganz anders als bei CID und LID. Auch hier ist eine Ähnlichkeit zu ECD-Spektren festzustellen.

Die In-Source-Fragmentierung hat aber einen unübersehbaren Nachteil: Es sind die Spektren im Bereich der leichten Ionen bis etwa zur Masse 1000 atomaren Masseneinheiten, die beispielsweise für die Analyse der Proteinenden wichtig sind, sehr stark durch zahlreiche Fragmente der Matrixsubstanz und ihrer Oligomere, möglicherweise aber auch durch andere kleine Ionen, die durch Reaktionen verschiedenster Art im heißen MALDI-Plasma entstanden sind, verunreinigt und verrauscht. Eine sinnvolle Interpretation der Spektren ist erst ab etwa 1000 Masseneinheiten möglich; um eine Überlastung der Ionendetektoren durch ein Übermaß an kleinen Ionen zu vermeiden, werden die ISD-Spektren daher überhaupt nur von der Masse 1000 an aufgenommen. Für Proteine heißt das, dass die Sequenz der ersten acht Aminosäuren nicht erkennbar ist. Gerade die für viele analytische Zwecke interessante endständige Sequenz entzieht sich der Analyse.

Vorteilhaft ist aber, dass die Spektren der ISD-Fragmentionen recht gleichmäßig bis in höhere Massenbereiche von etwa 5000 Tausend Masseneinheiten reichen, wenn größere Proteine gemessen werden. Eine Ausnahme findet sich, wenn das Protein eine Vernetzungsstelle (cross link) aufweist, also beispielsweise eine Disulfidbrückenbindung zwischen zwei Cysteinen. An der Vernetzungsstelle bricht die betreffende b- oder y-ISD-Fragmentionenreihe abrupt ab, da hier jeweils zwei Bindungen zu brechen wären.

Die Fragmentationen durch In-Source-Zerfall sind hoch angeregt und daher in sich wieder stark metastabil und zerfallen in größerem Maße auf dem Flug durch das Massenspektrometer. Sie werden daher nach herrschender Lehre nur in linearen Massenspektrometern (ohne Reflektor oder ohne Benutzung des Reflektors) gemessen, da hier die Fragmentationen und die aus einem Teil von ihnen durch Zerfall entstandenen Enkelionen zur gleichen Zeit ankommen und starke Signale liefern, wenn auch nicht mit zufriedenstellend hohem Massenauflösungsvermögen für eine gute Massenbestimmung. Da die Zerfälle immer auch freiwerdende Bindungsenergie in kinetische Energie umwandeln, einige Ionen also beschleunigen, andere verlangsamen, verbreitert sich das Ionensignal und verschlechtert so das Massenauflösungsvermögen. Nach herrschender Meinung führe eine Messung in einem Reflektor-TOF zu noch wesentlich stärker verrauschten Spektren, als sie in linearen Spektrometern gemessen werden.

Entgegen dieser herrschenden Lehre führt die Verwendung eines Reflektors dagegen zu guten Spektren mit stark verbesserter Massenauflösung, wobei sich das an sich starke Rauschen im Massenbereich von 1000 bis 5000 atomaren Masseneinheiten nicht bemerkbar macht. Es werden in diesem Massenbereich durchgehend gute Auflösungen der Isotopenstruktur erzielt, verbunden mit entsprechender Genauigkeit der Massenbestimmung.

Diese Fragmentierungsmethode wäre somit wegen ihrer gleichmäßigen Fragmentierung und ihrer guten Massengenauigkeit für die Fragmente gut geeignet, die Sequenzen größeren Proteinen zu bestimmen. Sie scheitert aber daran, dass gerade die terminalen Sequenzen von Proteinen wegen des verrauschten Spektrums nicht ermittelt werden können.

Aufgabe der Erfindung

Es ist die Aufgabe der Erfindung, Spektren von Biopolymeren zu erzeugen, die Informationen über die endständigen Sequenzen der Bausteine von Biopolymeren enthalten.

Kurze Beschreibung der Erfindung

Diese Aufgabe wird durch ein Verfahren der Aufnahme von Enkelionenspektren in einem Tandem-Massenspektrometer mit einer Ionisierung der Biopolymere durch matrixunterstützte Laserdesorption gelöst, das durch die kennzeichnenden Merkmale des Anspruchs 1 oder durch die Verfahrensschritte des Anspruchs 4 beschrieben wird. Günstige Ausformungen des Verfahrens und der Bestimmung der Sequenz von Proteinen werden durch die abhängigen Ansprüche beschrieben. Ein einfaches Verfahren zur Neubestimmung terminaler Sequenzen, das auf der Erfindung beruht, ist in Anspruch 12 gegeben.

Die Erfindung besteht darin, in einem Tandem-Massenspektrometer mit einer Ionenquelle zur Ionisierung des Biopolymers durch matrixunterstützte Laserdesorption zunächst durch hohe Laserenergiedichte in der Ionenquelle ISD-Fragmentionen der Biopolymere zu erzeugen, eine Sorte dieser ISD-Fragmentionen dann einer weiteren Fragmentierung durch Gasstöße (CID = collision induced decomposition), Oberflächenstöße (SID = surface induced decomposition), Photonenstöße (PID = photon induced decomposition) oder metastabilen Zerfall (LID = laser induced decomposition) zu unterwerfen und die so entstandenen Enkelionen als Massenspektrum zu messen.

Im Folgenden wird für die Enkelionen deren Herstellung durch die vorangestellte Abkürzungen der Fragmentierungsmechanismen gekennzeichnet: ISD-LID-Enkelionen sind also Ionen, die durch metastabilen Zerfall (LID = Laser Induced Decomposition) aus ISD-Fragmentionen (ISD = In-Source Decay) entstanden sind.

In einzelne Verfahrensschritte aufgelöst, besteht die Erfindung darin, Biopolymer mit Matrixsubstanz vermischt auf einen Probenträger zu präparieren, den Probenträger in die Ionenquelle einzuführen, die präparierte Probe durch Laserbeschuss mit einer gegenüber normalem MALDI erhöhten Energiedichte in einem Tandem-Massenspektrometer einer Ionenerzeugung mit In-Source-Zerfall zu unterwerfen, eine Sorte so erzeugter ISD-Fragmentionen im ersten Spektrometer auszuwählen und mit dem Fragmentierungsmechanismus des betreffenden Tandem-Massenspektrometers weiter zu fragmentieren, und die so entstandenen Enkelionen im zweiten Massenspektrometer massendispergiert als Enkelionenspektrum zu messen.

Insbesondere kann dazu ein Tandem-Flugzeitmassenspektrometer (TOF/TOF-MS) verwendet werden.

Ein besonders günstiges Verfahren zur Bestimmung der terminalen Sequenzen eines Biopolymers besteht darin, dass zunächst mindestens zwei erfindungsgemäße Enkelionenspektren verschiedener ISD-Fragmentionensorten der gleichen Fragmentierungsreihe (also beispielsweise der b-Serie) aufgenommen werden. Durch einen Vergleich dieser Enkelionenspektren aus verschiedenen ISD-Fragmentionen können die N-terminalen und C-terminalen Ionenseerien (also für LID-Fragmentierungen normalerweise die b- und die y-Serie) festgestellt werden, weil jeweils eine Ionenserie in den Enkelionenspektren feststeht und sich die gegenläufige Ionenserie von Spektrum zu Spektrum verschiebt, wie aus dem Schema in Abbildung 6 ersichtlich. Aus diesen terminalen Ionenserien, die jetzt nur noch beispielsweise die b-Ionen enthalten, kann anhand der Massendifferenzen das terminale Sequenzmuster der Bausteine des Biopolymers herausgelesen werden.

Eine solche Bestimmung der endständigen Sequenzen kann leicht durch ein geeignetes Computerprogramm vorgenommen werden.

Kurze Beschreibung der Abbildungen

Abbildung 1 beschreibt an einem schematischen Beispiel die Nomenklatur der Fragmentionenserien für Proteine.

Abbildung 2 zeigt das ISD-Spektrum des Enzyms RNase-B im Massenbereich von 1000 bis 2800 atomaren Masseneinheiten mit klar betonter c-Fragmentionenserie von c_9 bis c_{25} . Die y-Fragmentionenserie bricht bei y_{12} ab, da hier eine Vernetzungsstelle eines Cysteins folgt. Das Spektrum wurde mit DHB als Matrixsubstanz aufgenommen.

Abbildung 3 zeigt Schema und Inhalte der ISD-LID-Enkelionenspektren, jeweils ausgehend von einem c-ISD-Fragmention und einem y-ISD-Fragmention.

Abbildungen 4 und 5 geben die ISD-LID-Enkelionenspektren des c_{14} -ISD-Fragmentions und des y_{12} -ISD-Fragmentions der RNase-B wieder, beide mit DHB als Matrix.

Abbildung 6 skizziert ein günstiges Schema einer Spektrennahme für die leichte de-novo-Sequenzierung terminaler Sequenzen.

Besonders günstige Ausführungsformen

In Massenspektrometern werden an sich nur Massen-zu-Ladungs-Verhältnisse (m/z) der Ionen gemessen, niemals die Massen der Ionen selbst. Die Spektren sind niemals „Massenspektren“, sondern eigentlich „Masse-zu-Ladungs-Spektren“. Da jedoch im MALDI-Prozess praktisch nur einfach geladene Ionen erzeugt werden, ist der Wert für die Ladung immer eine Einheitsladung ($z = 1$), daher kann hier aus Gründen sprachlicher Vereinfachung einfach von der Masse der Ionen gesprochen werden. In diesem Sinn ist es zu verstehen, wenn im Folgenden beispielsweise von „leichten Ionen“ oder dem „unteren Massenbereich des Spektrums“ gesprochen wird.

Die Erfindung besteht darin, die mit Matrixsubstanz gemischten Biopolymerproben auf einem Probenträger in einem gewöhnlichen Tandem-Massenspektrometer, das mit einer Ionisierung durch matrixunterstützte Laserdesorption arbeitet, zunächst durch Erhöhung der Laserenergiedichte einer In-Source-Fragmentierung der im MALDI-Prozess erzeugten Proteinionen zu unterwerfen, die entstehenden ISD-Fragmentionen in das erste Massenspektrometer einzuschießen, dort zu selektieren und mit den Mitteln dieses Tandem-Massenspektrometers zu fragmentieren, und die entstehenden Enkelionen im zweiten Flugzeitspektrometer massendispersiert als Enkelionenspektrum zu messen. Aus diesen Enkelionenspektren lassen sich insbesondere die terminalen Sequenzmuster der Biopolymere bestimmen.

Unter Biopolymeren werden hier ganz allgemein Proteine und ihre Konjugate wie Glycoproteine oder Lipoproteine, aber auch genetisches Material oder Polysaccharide verstanden.

Im Folgenden wird das Verfahren der Informationsgewinnung über terminale Sequenzmuster auf Proteinmoleküle beschränkt und anhand eines Tandem-Flugzeitmassenspektrometers mit

15 einer zweiten Fragmentierung durch metastabilen Zerfall der ISD-Fragmentionen beschrieben, ohne dass durch diese Beschränkungen die Erfindung eingeengt werden soll. Es wird also im Folgenden von einem ungeänderten, kommerziellen TOF/TOF-Massenspektrometer ausgegangen, obwohl sich ein erfindungsgemäßes Verfahren auch auf anderen Typen von Tandem-Massenspektrometern realisieren lässt.

10 Zunächst wird ein Spektrum der ISD-Fragmentionen im normalen Reflektormodus des Tandem-Flugzeitmassenspektrometers, also mit ausgeschaltetem TOF/TOF-Modus, gemessen. In Abbildung 2 ist ein solches ISD-Fragmentionenspektrum wiedergegeben. Dabei wird nur der Massenbereich oberhalb von 1000 atomaren Masseneinheiten detektiert, um Überlas-

15 tungen des Detektors durch die hohe Anzahl von leichten Ionen unterhalb von 1000 Masseneinheiten zu vermeiden. Es entsteht dabei ein Spektrum, das als Basis für die Auswahl der ISD-Fragmentionen für die Enkelionenspektrennahme dient.

Für die Auswahl der ISD-Fragmentionen zur weiteren Untersuchung ist es günstig, wenn bereits das ISD-Spektrum so weit interpretiert werden kann, dass die Ionensignale der c-, a-, oder y-Reihe zugeordnet werden können.

20 Die Interpretation kann durch die Wahl der Matrixsubstanz erleichtert werden. Proteinspektren, die durch ISD entstehen, enthalten ganz allgemein bevorzugt Tochterionen der c-Reihe für N-terminale Ionen. Bei Verwendung von α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure (CHCA) als Matrix treten nun die Tochterionen der a-Reihe vergleichbar intensiv wie die c-Ionen auf. Da der Massenunterschied 45 Masseneinheiten beträgt, lassen sich die Paare a/c-Ionen leicht herausfinden. Die Verwendung von CHCA führt außerdem aus bekannten Gründen zu den genauesten Massenbestimmungen. Die Erläuterung der Gründe würde hier zu weit führen. Andererseits ist CHCA für die Erzeugung von ISD-LID-Enkelionenspektren sehr nachteilig, da die mit CHCA höchstangeregten ISD-Fragmentionen zu viel kleinem Müll zerfallen.

25 Die Verwendung von 2,5-Dihydroxy-Benzoessäure (DHB) führt zu weit geringeren Intensitäten der a-Ionen (Abbildung 2), bei erträglich guten Intensitäten für die y-Ionen. Die Massengenauigkeit der ISD-Fragmentionenspektren ist nur mäßig gut. DHB führt aber zu den besten ISD-LID-Enkelionenspektren.

30 Wird 3,5-Dimethoxy-4-Hydroxy-Zimtsäure (Sinapinsäure) als Matrix verwendet, so treten sehr klar die c-Ionen als Serie heraus, während die y-Ionen zurücktreten und die a-Ionen praktisch nicht mehr sichtbar sind. Die Sinapinsäure ist damit besonders geeignet, die Serie der c-Ionen zu erkennen. Die Erzeugung von ISD-LID-Enkelionenspektren ist mit Sinapinsäure eher schwierig; es ist jedoch möglich, dass sich diese Sinapin-ISD-Fragmentionen für eine weitere Fragmentierung durch Stöße (CID) gut eignen.

35 Für die Messung der metastabil entstandenen ISD-LID-Enkelionen der ausgewählten ISD-Fragmentionen wird das Massenspektrometer dann auf TOF/TOF-Betrieb umgestellt. Es

lassen sich dann mit weiteren Laserschüssen aus dem Gemisch der Ionen jeweils beliebige ISD-Fragmentionen selektieren; die durch metastabilen Zerfall aus diesen Ionen erzeugten ISD-LID-Enkelionenspektren können als Massenspektrum gemessen werden.

Wenn die ausgewählten ISD-Fragmentionen der a- oder der c-Reihe angehören (in Abbildung 4 ist das ISD-LID-Enkelionenspektrum eines c_{14} -ISD-Fragmentions gezeigt), so werden durch metastabilen Zerfall ISD-LID-Enkelionenspektren gewonnen, die ganz bevorzugt nur aus Ionensignalen der b- und der y-Reihe bestehen, mit Beimischungen von einigen Ionen der a-Reihe. Aus Ionen der c-Reihe entstehen Peptidamid-Ionen, die Indices der y-Reihe in Abbildung 4 sind jetzt auf diese Peptidamid-Ionen ausgerichtet (nicht mehr auf das ursprüngliche Protein). Die Ionensignale der b- und der y-Reihe reichen im unverrauschten Enkelionenspektrum bis zur endständigen Aminosäure und bestätigen, wenn bekannt, die Sequenz vom N-Terminus an bis zur Masse des ausgewählten Fragmentions. In Abbildung 4 sind über dem Spektrum die aus den Massendifferenzen erkennbaren Aminosäuren der an sich bekannten Sequenz der RNase-B angezeigt; es ist damit die richtige Sequenz des N-Terminus bestätigt. Da die innere Energie der ISD-Fragmentionen sehr hoch ist, entstehen durch Doppelbrüche auch einige so genannte Immoniumionen, die aus einzelnen Aminosäuren entstehen und das Vorhandensein dieser Aminosäuren im ISD-Fragmention anzeigen. Es sind auch einige innere ISD-LID-Enkelionen vorhanden, die aus zwei bis fünf inneren Aminosäuren bestehen. Sind diese inneren Ionen sehr häufig, so erschweren sie die Interpretation des Enkelionenspektrums.

Gehören die ISD-Fragmentionen der y-Reihe an (in Abbildung 5 ist ein ISD-LID-Enkelionenspektrum eines y_{12} -ISD-Fragmentions dargestellt), so werden durch den metastabilen Zerfall ISD-LID-Enkelionen der b- und der y-Reihe gebildet, ebenfalls mit geringen Zumischungen von anderen Reihen, und zwar wiederum jeweils bis zum C-Terminus. Die Indizierung der b-Ionen bezieht sich auch hier auf das ISD-Fragmention, nicht auf das ursprüngliche Protein. Auch hier wird das richtige Sequenzmuster der RNase-B am C-Terminus bestätigt.

Die Erfindung eignet sich also besonders für die Überprüfung einer an sich bekannten endständigen Sequenz eines Proteins, also beispielsweise für Qualitätskontrollen. Es ist hier herauszuheben, dass es praktisch keine andere Methode für die Bestätigung der Sequenz am C-Terminus gibt. Die Edman-Sequenzierung versagt hier ebenso wie andere massenspektrometrische Methoden. – Die Erfindung kann aber auch für so genannte eine de-novo-Bestimmung von endständigen Proteinsequenzen eingesetzt werden.

Für die de-novo-Bestimmung N-terminaler Sequenzen werden zweckmäßigerweise zwei (oder mehr) Enkelionenspektren aus mehreren c-ISD-Fragmentionen gewonnen. Diese c-Fragmentionen sind meistens gut im ISD-Fragmentionenspektrum als herausragende Ionensignale zu erkennen (siehe Abbildung 2) oder sie können durch ISD-Spektren mit CHCA oder Separinsäure als Matrix erkannt werden. In den verschiedenen Enkelionenspektren (vorzugsweise mit

17
DHB als Matrix aufgenommen) verschieben sich nun die b- und y-Fragmentierungsionen-
serien in den verschiedenen Enkelionenspektren gegeneinander, wie in Abbildung 6 schema-
tisch dargestellt. Aus einem Vergleich der Enkelionenspektren können daher die b- und y-
Ionenserien der N-terminalen Peptidamidionen durch ihre Verschiebungen erkannt und
5 extrahiert werden; es lassen sich so praktisch reine b- und y-Serien der Enkelionen herausle-
sen. Dieses Herauslesen reiner b- und y-Ionenserien kann beispielsweise durch ein Computer-
programm automatisiert werden.

Die N-terminale Sequenz der Proteine kann nun einfach aus den Massendifferenzen dieser
extrahierten b- und y- Ionenserien der endständigen Proteinamidionen und den Enkelionen-
10 spektren abgelesen werden. Wie immer bei der Bestimmung der Proteinsequenzen aus
Differenzen von Massensignalen, können dabei die beiden Aminosäurebausteine Leucin und
Isoleucin nicht unterschieden werden, da sie gleiche Masse besitzen. Die beiden Aminosäuren
Lysin und Glutamin, die sich nur um 36 Millimasseneinheiten unterscheiden, können nur
15 durch sehr genaue Massenbestimmungen unterschieden werden. Alle anderen Aminosäuren
unterscheiden sich um mindestens eine atomare Masseneinheit. Dieses Problem ist allen
massenspektrometrischen Sequenzbestimmungen eigen und wird von allen kommerziellen
bioinformatischen Computerprogrammen entsprechend berücksichtigt. Wenn daher hier von
Sequenzbestimmung von Proteinen oder Peptiden die Rede ist, bleibt stets die Unterscheidung
von Leucin und Isoleucin, und meist auch die Unterscheidung von Lysin und Glutamin offen.

20 Die C-terminale Sequenz kann analog aus zwei (oder mehr) Enkelionenspektren aus y-ISD-
Fragmentionen gewonnen werden. Die y-ISD-Fragmention bleiben in den mit DHB als Matrix
aufgenommenen ISD-Spektren als Rest über, wenn die a- und c-Ionen als erkannt ausge-
klammert werden. Es soll hier noch einmal herausgestellt werden, dass die Erkennung der C-
terminalen Sequenz mit dieser Erfindung praktisch einzigartig und daher von unschätzbarem
25 Wert ist.

Brechen im ISD-Fragmentionenspektrum die y- oder b-Serien ab, so liegt hier eine Vernet-
zung vor. In diesem Fall kann man die Vernetzung mit biochemischen Mitteln auflösen. Die
Disulfidbrücken zwischen Cysteinen lassen sich beispielsweise durch eine Oxidation, aber
auch durch eine Reduktion mit nachfolgender Alkylierung auflösen.

30 Für vollständige Sequenzbestimmungen von kleineren Proteinen und von größeren Peptiden
können jeweils N-terminale und C-terminale ISD-Fragmentionen so groß ausgewählt werden,
dass in der Mitte der Moleküle eine größere Überlappung der Sequenz zu sehen ist, die es
erlaubt, die beidseitigen terminalen Sequenzen zu einer Gesamtsequenz zusammenzusetzen.
Die für die Enkelionenspektren ausgewählten ISD-Fragmentionen müssen also jeweils
35 schwerer sein als das halbe Gesamtmolekül (genauer: die Summe der Massen zweier gegen-
ständig untersuchter Fragmentionen muss um mindestens etwa vier Aminosäuren größer sein
als die Gesamtmasse des untersuchten Moleküls).

Für die möglichst vollständige Sequenzbestimmung von sehr großen Proteinen ist es günstig, die Proteine durch ein Enzym zu verdauen, die Verdaupeptide durch selektive Verfahren (Chromatographie oder Elektrophorese) voneinander zu trennen, und dann getrennt der Analyse mit dem erfindungsgemäßen Verfahren zuzuführen. Dabei ist es zweckmäßig, nicht
5 einen tryptischen Verdau zu wählen, der wegen seiner Spaltung an zwei verschiedenartigen Aminosäuren Spaltstücke mit einer durchschnittlichen Länge von nur 10 Aminosäuren liefert, sondern ein Enzym, das nur an einem Typ von Aminosäure spaltet und somit Spaltstücke einer mittleren Länge von 20 Aminosäuren erzeugt.

Die Erfindung kann, wie oben bereits beschrieben, besonders für eine Überprüfung einer
10 vermuteten Sequenz eingesetzt werden, zum Beispiel für Qualitätskontrollen synthetisierter Proteine. Die Synthesen können chemischer Art sein, oder rekombinanter Art in Bakterien. Besonders bei rekombinanter Synthese der Proteine ist die Herstellung einer sauberen Sequenz der Proteinkettenenden schwierig.

Für automatische Qualitätskontrollen der Synthese von Proteinen lassen sich mit einem
15 TOF/TOF-Massenspektrometer ISD-LID-Enkelionenspektren von einer größeren Anzahl von ISD-Fragmentationen eines vorgewählten Massenbereichs, beispielsweise von 1000 bis 2000 atomaren Masseneinheiten, automatisch messen. Durch automatisierte Annotationen mit der vermuteten, richtigen terminalen Sequenz durch entsprechende Computerprogramme lassen sich Bestätigungen dieser Sequenz in automatisierter Weise finden. Werden dabei Spektren
20 gefunden, für die Annotationen mit der richtigen Sequenz keinen Sinn ergeben oder die eine Massenverschiebung am Terminus zeigen, so ist das Protein nicht richtig synthetisiert. Durch einen Vergleich verschiedener Enkelionenspektren lassen sich terminale b- oder y-Reihen von Enkelionen finden, die die Art der Modifikation bei der Synthese anzeigen.

Die hier beschriebene erfindungsgemäße Aufnahme von Enkelionenspektren, die Informatio-
25 nen über endständige Sequenzen von Proteinen enthalten, lassen sich auch durch andere Arten der zweiten Fragmentierung der ISD-Fragmentationen erhalten. So ist in TOF/TOF-Massenspektrometern meist auch die Möglichkeit zu einer Stoßfragmentierung (CID) enthalten, die erfindungsgemäß zusätzlich zum metastabilen Zerfall (LID) genutzt werden kann. Die Stoßfragmentierung liefert zusätzlich auch w- und d-Ionen, die für eine Unterscheidung von
30 Leucin und Isoleucin genutzt werden können.

Aber auch andere Arten von Tandem-Massenspektrometern können für erfindungsgemäße Verfahren der Spektrennahme eingesetzt werden, wie beispielsweise die Kombination von Quadrupolfiltermassenspektrometern und Flugzeitmassenspektrometern mit orthogonalem Einschuss der Ionen, wenn sie mit einer Ionenquelle zur Ionisierung durch matrixunterstützte
35 Laserdesorption versehen sind. Dabei ist jedoch zu beachten, dass in der Stoßzelle und in den Ionenführungsvorrichtungen (ion guides), die meist als quadrupolare, hexapolare oder octopolare Stabsysteme ausgebildet sind, keine leichten Ionen unterhalb einer Massenschwelle

gespeichert werden können und daher diese leichten Ionen verloren gehen. Alle Hochfrequenz-Multipolstabsysteme besitzen untere Massengrenzen für die Speicherfähigkeit für Ionen.

5 Hochfrequenz-Quadrupol-Ionenfallenmassenspektrometer sind nicht besonders günstig für diese Erfindung, weil sie ebenfalls eine untere Massenschwelle für die Speicherung von Ionen besitzen. Im Gegensatz dazu lassen sich Fourier-Transform-Massenspektrometer sehr gut verwenden, wenn sie mit MALDI-Ionenquellen ausgestattet sind. In diesen Spektrometern, die keine untere Massengrenzen haben, lassen sich die ISD-Fragmentionen sowohl durch Stoßfragmentierung (CID) wie auch durch Infrarot-Multiphotonen-Dissoziation (PID) in die
10 Enkelionen zerlegen.

Auch die seltener angewandte Fragmentierung von Ionen an geeignet präparierten Oberflächen (SID = Surface Induced Decomposition) lässt sich anwenden. Es sind Tandem-Massenspektrometer mit dieser Fragmentierungsart bekannt.

Ansprüche

1. Verfahren zur Aufnahme von Massenspektren, die Informationen über terminale Sequenzen eines Biopolymers enthalten; in einem Tandem-Massenspektrometer mit einer Ionenquelle zur Ionisierung des Biopolymers durch matrixunterstützte Laserdesorption, *dadurch gekennzeichnet, dass*
eine Sorte der durch eine hohe Laserenergiedichte in der Ionenquelle erzeugten ISD-Fragmentationen der Biopolymere im Tandem-Massenspektrometer einer weiteren Fragmentierung durch Gasstöße (CID), Oberflächenstöße (SID), Photonenstöße (PID) oder metastabilen Zerfall (LID) unterworfen wird und dass die so entstandenen Enkelionen als Massenspektrum gemessen werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem Tandem-Massenspektrometer um ein Tandem-in-der-Zeit-Massenspektrometer oder um ein Tandem-im-Raum-Massenspektrometer handelt.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass sich das Tandem-im-Raum-Massenspektrometer aus Magnetmassenspektrometern, Quadrupolfiltermassenspektrometern, Ionenfallenmassenspektrometern oder Flugzeitmassenspektrometern zusammensetzt.
4. Verfahren zur Aufnahme von Massenspektren, die Informationen über terminale Sequenzen eines Biopolymers enthalten, in einem Tandem-Massenspektrometer mit einer Ionenquelle zur Ionisierung des Biopolymers durch matrixunterstützte Laserdesorption, bestehend aus folgenden Schritten:
 - (a) Biopolymermoleküle und Matrixsubstanz werden auf einem Probenträger zu einer Probe präpariert,
 - (b) der Probenträger wird in die Ionenquelle eingebracht,
 - (c) die Probe auf dem Probenträger wird mit einem Puls laser mit einer solch hohen Energiedichte beschossen, dass eine spontane Fragmentierung eines Teils der entstehenden Ionen des Biopolymers stattfindet und verschiedenartige ISD-Fragmentationen entstehen,
 - (d) die Ionen werden beschleunigt und in das erste Massenspektrometer eines Tandem-Massenspektrometers eingeschossen,
 - (e) eine Sorte der ISD-Fragmentationen wird im ersten Massenspektrometer selektiert und mindestens teilweise zu Enkelionen fragmentiert, und
 - (f) die Enkelionen werden im zweiten Massenspektrometer des Tandem-Massenspektrometers als Massenspektrum gemessen.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem Tandem-Massenspektrometer um ein Quadrupolfilter und ein Flugzeitmassenspektrometer mit orthogonalem Ioneneinschuss handelt.

6. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem Tandem-Massenspektrometer um zwei koaxial angeordnete Flugzeitmassenspektrometer (TOF/TOF) handelt.
- 5 7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Fragmentierung der ISD-Fragmentionen zu Enkelionen im ersten Flugzeitmassenspektrometer durch Stoßfragmentierung (CID) oder metastabilen Zerfall (LID) bewirkt wird.
- 10 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass der Spektrenaufnahme der Enkelionen eine Spektrenaufnahme der in der Ionenquelle durch den starken Laserbeschuss erzeugten ISD-Fragmentionen vorausgeht und dass die Signale der ISD-Fragmentionen zur Auswahl der ISD-Fragmentionen für die Spektrenaufnahme der Enkelionenspektren dienen.
- 15 9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Biopolymeren um Proteine handelt und dass als Hilfe zur Auswahl der ISD-Fragmentionen Spektrenaufnahmen der ISD-Fragmentionen mit verschiedenen Matrixsubstanzen verwendet werden.
- 10 10. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Biopolymeren um Proteine handelt und dass vor einer Spektrenaufnahme Vernetzungen der Proteine aufgelöst werden.
- 20 11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass Disulfidbrücken zwischen Cysteinen durch Reduktion und Alkylierung oder durch Oxidation aufgelöst werden.
- 30 12. Verfahren zur Bestimmung der terminalen Sequenzen eines Proteins, dadurch gekennzeichnet, dass Enkelionenspektren verschiedener ISD-Fragmentionensorten der gleichen Fragmentierungsserie aufgenommen werden, dass durch Vergleich der Enkelionenspektren von ISD-Fragmentionen aus der gleichen Fragmentierungsserie die N-terminalen und C-terminalen Ionenserien dieser ISD-Fragmentionen festgestellt werden, wobei die Ionenserien daran erkannt werden können, dass eine Ionenserie in den Enkelionenspektren jeweils feststeht, während die andere Ionenserie von Spektrum zu Spektrum verschoben erscheint, und dass aus den terminalen Ionenserien anhand der Massendifferenzen das terminale Sequenzmuster des Proteins herausgelesen wird.
- 35 13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Erkennung der N-terminalen oder C-terminalen Ionenserien aus den Messdaten der Enkelionenspektren durch ein Computerprogramm erfolgt.
14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass auch die Bestimmung des Sequenzmusters durch ein Computerprogramm erfolgt.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft die Spektrenaufnahme von Biopolymeren, besonders von Proteinen, in Tandem-Massenspektrometern mit Ionisierung durch matrixunterstützte Laserdesorption (MALDI) für die Überprüfung oder die Bestimmung von Sequenzmustern.

- 5 Die Erfindung besteht darin, Enkelionenspektren von terminalen Fragmentionen der Biopolymere in Tandem-Massenspektrometern zu messen, indem eine so genannte In-Source-Fragmentierung zur Erzeugung einer ersten Generation von Fragment- oder Tochterionen eines Biopolymers mit einer nachfolgenden Messung von Enkelionen, die durch eine weitere Fragmentierung einer ausgewählten Sorte von Tochterionen gewonnen wurden, gekoppelt
- 10 wird. Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt die Bestimmung der terminalen Sequenzen, die sonst nur mit Schwierigkeiten gemessen werden können.

Abbildung 3

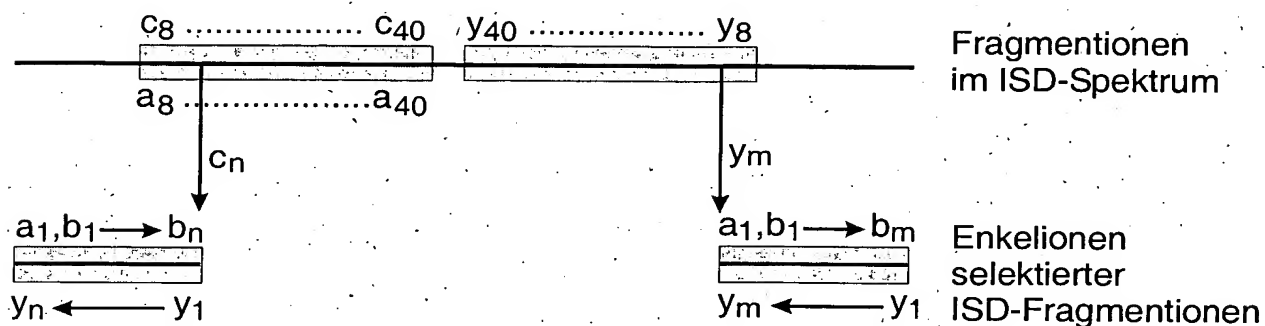


Abbildung 3

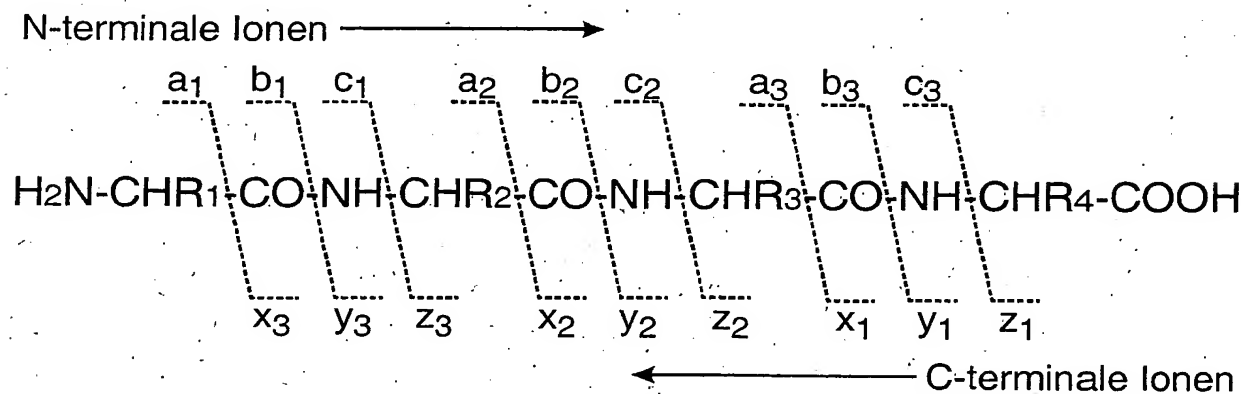


Abbildung 1

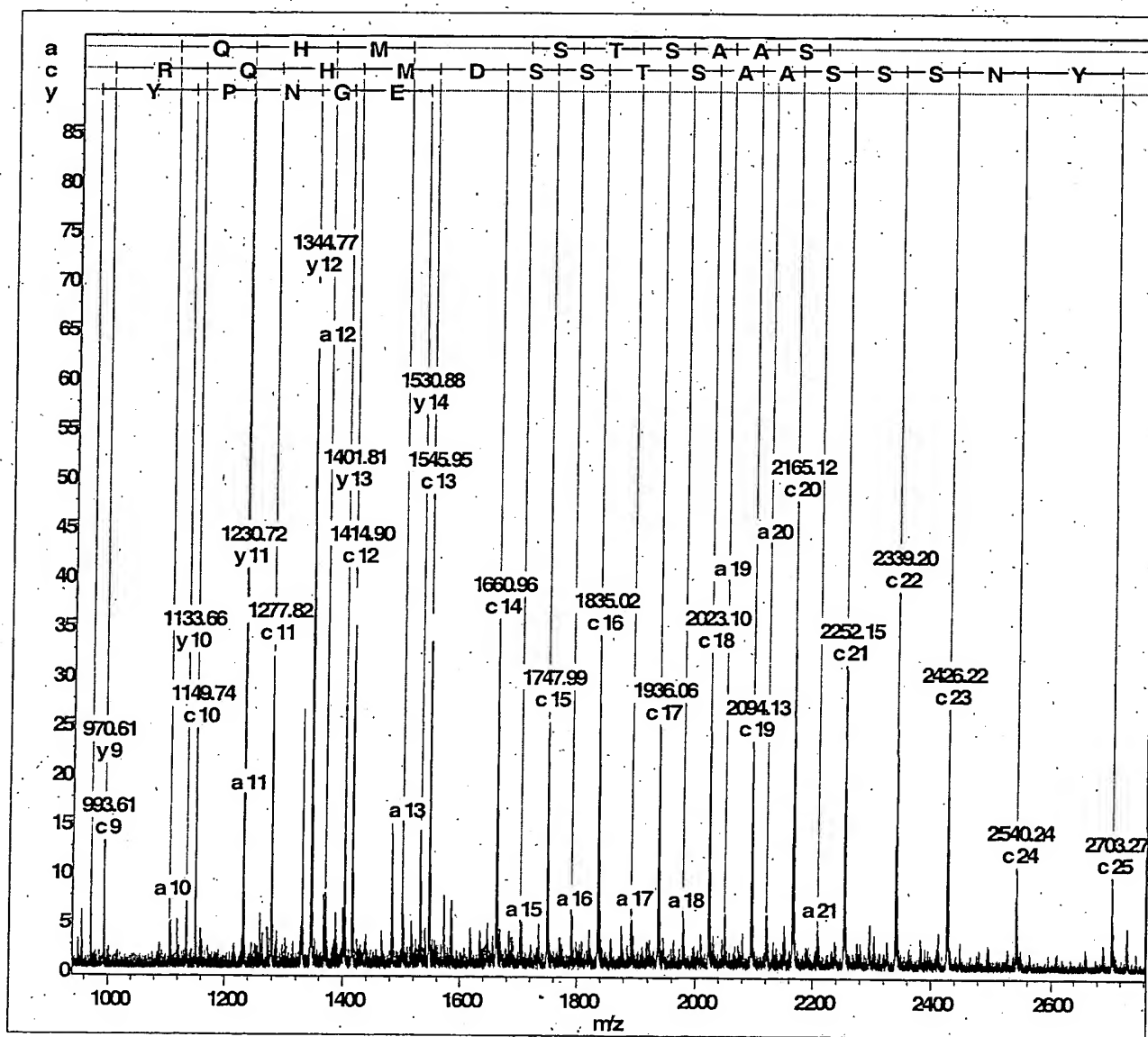


Abbildung 2

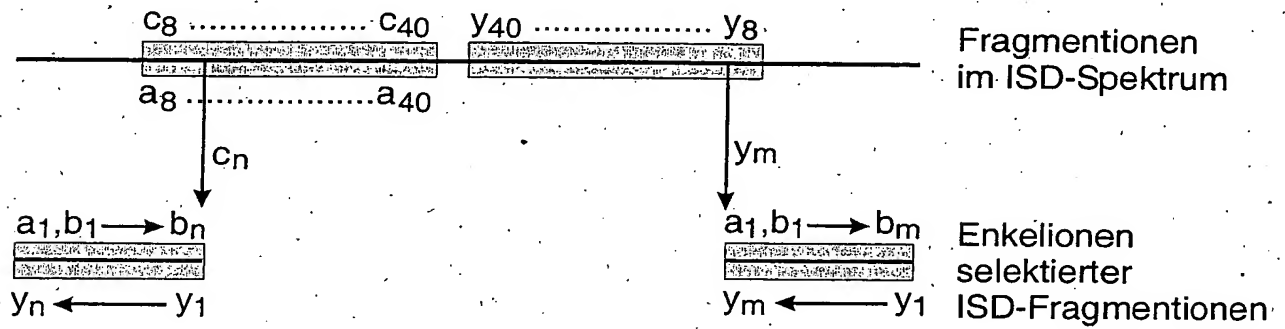


Abbildung 3

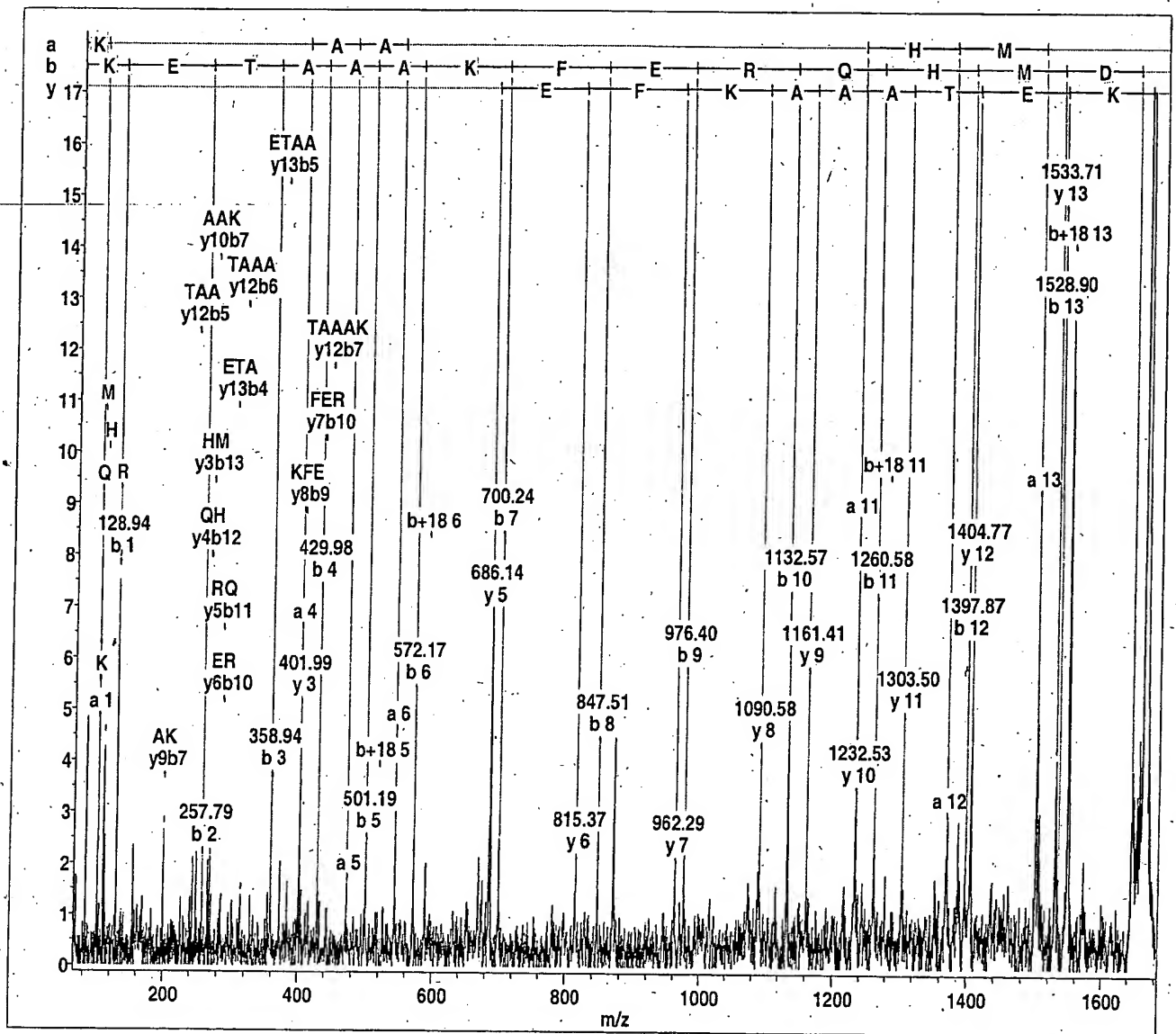


Abbildung 4

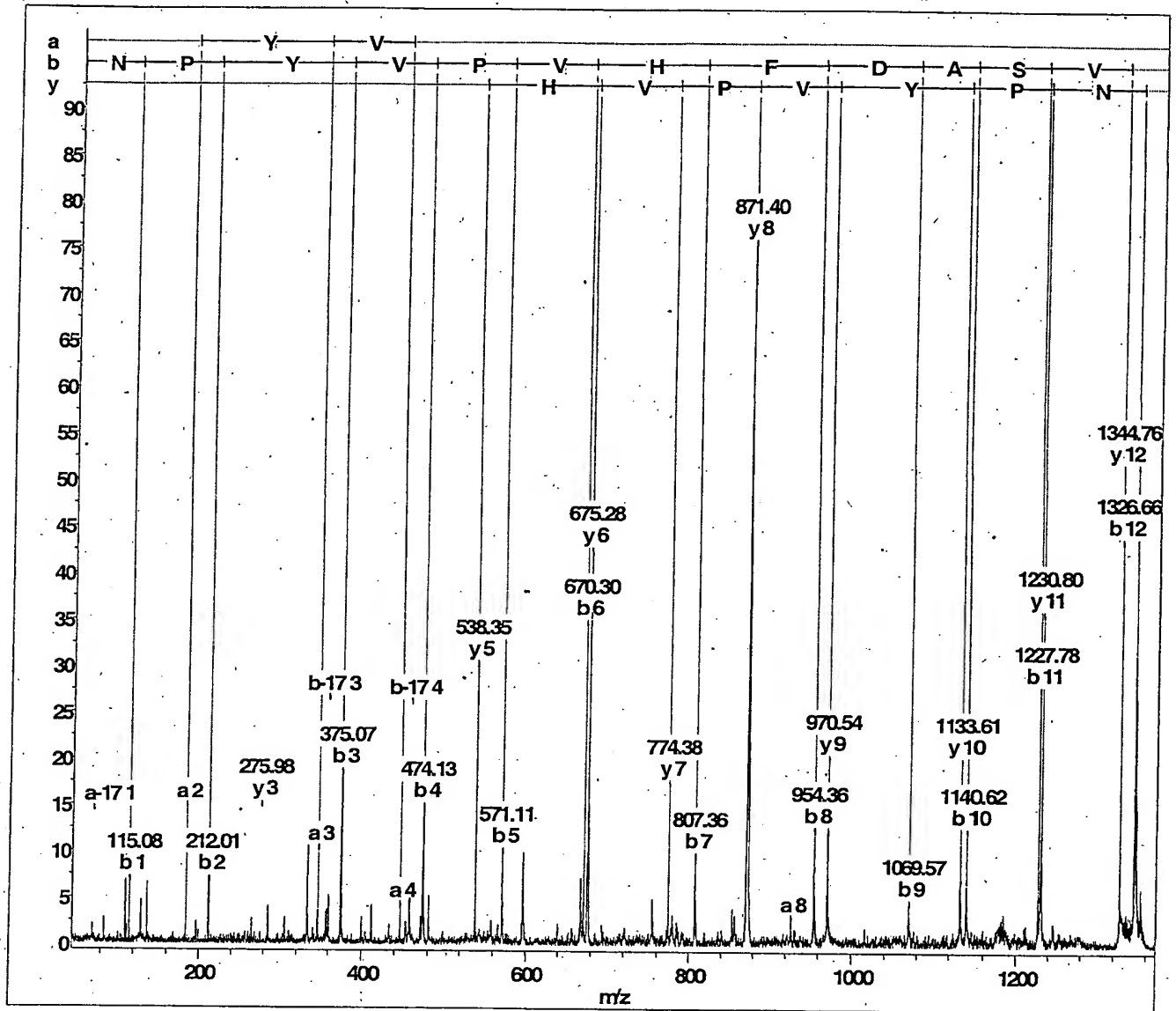


Abbildung 5

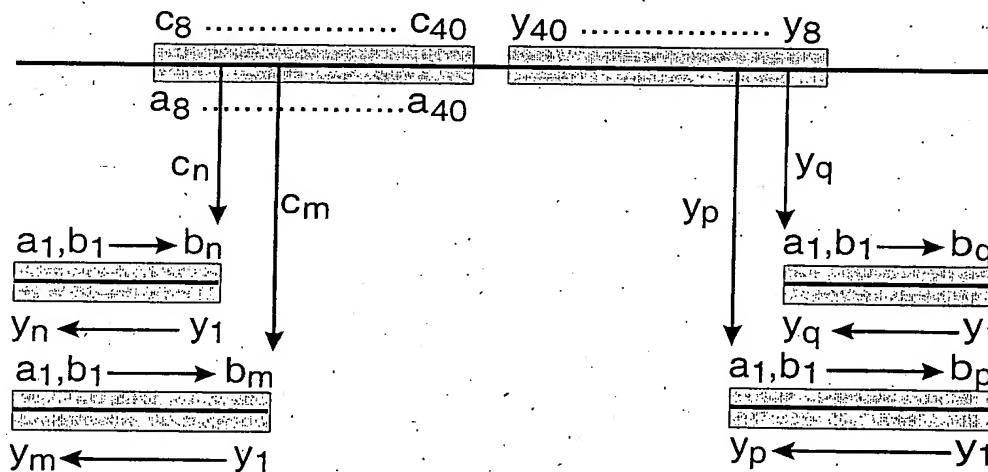


Abbildung 6



Creation date: 01-22-2004

Indexing Officer: SGEBREHIWOT - SARA GEBREHIWOT

Team: OIPEScanning

Dossier: 10758970

Legal Date: 01-16-2004

No.	Doccode	Number of pages
1	TRNA	2 ✓
2	SPEC	38 ✓
3	CLM	6 ✓
4	ABST	1 ✓
5	DRW	1 ✓
6	OATH	2 ✓
7	A.PE	1 ✓
8	SPEC	1 ✓
9	REM	1 ✓
10	IDS	3 ✓
11	CRFL	2 ✓
12	SEQLIST	20 ✓

Total number of pages: 78

Remarks:

Order of re-scan issued on